

Rec'd PCT/PTO 20 OCT 2004

Mod. C.E. - 1-47
10/511894



REC'D 29 SEP 2004

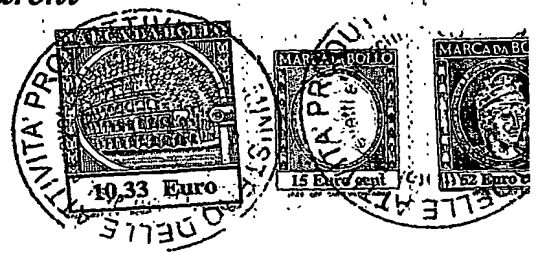
WIPO PCT

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

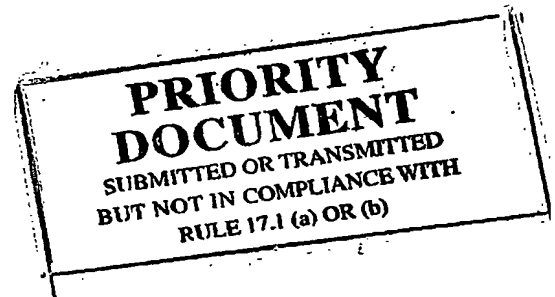


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N.MI 2002 A 000871 depositata il 23.04.2002**

EP/03/3923

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

ROMA li..... 22 SET. 2004



IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

Giampietro Carlotta

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO 3

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione INDENA S.p.A.
Residenza Milano codice 02411780150
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.
via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

"Derivati alogenati dell'iperforina, loro uso e formulazioni che li contengono"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

1) Bombardelli Ezio 3) Riva Antonella
2) Morazzoni Paolo 4) Fuzzati Nicola

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	_____
2) _____	_____	_____	____/____/____	_____

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	PROV	n. pag.	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 1) <u>12</u>	<u>PROV</u>	<u>118</u>	_____
Doc. 2) <u>10</u>	<u>PROV</u>	<u>n. tav. _____</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) <u>11</u>	<u>RIS</u>	_____	lettera d'incarico, procura e riferimento procura generale
Doc. 4) <u>10</u>	<u>RIS</u>	_____	designazione inventore
Doc. 5) <u>10</u>	<u>RIS</u>	_____	documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) <u>10</u>	<u>RIS</u>	_____	autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) <u>10</u>	_____	_____	nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro Centottantotto/51#COMPILATO IL 23/10/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Bianchetti Giuseppe

obbligatorio

CONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANOMILANOcodice 165

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 008871

Reg. A.

L'anno DUEMILADUEVENTITREdel mese di APRILE

(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, e ha(hanno) firmato _____

00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Kaloubinitimbro
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A 000871 REG. ADATA DI DEPOSITO 23/04/2002

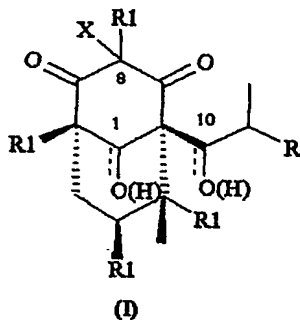
NUMERO BREVETTO _____

DATA DI RILASCIO / /

D. ^{TITOLO} Derivati alogenati dell'iperforina, loro uso e formulazioni che li
contengono

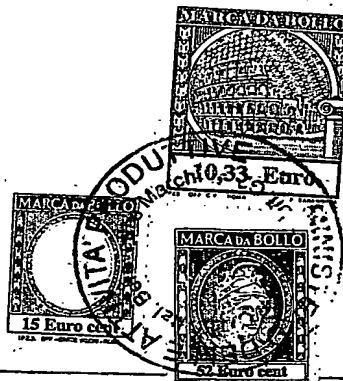
L. RIASSUNTO

Si descrivono derivati dell'iperforina e dell'adiperforina di formula generale (I)



in cui X, R ed R1 assumono i significati definiti nella descrizione, il loro metodo di preparazione e il loro uso in campo farmaceutico e/o nutrizionale nel trattamento degli stati di depressione e di ansia e nella prevenzione o trattamento del morbo di Alzheimer.

M. DISEGNO



6765 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

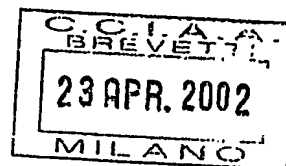
MV/mgg **"DERIVATI ALOGENATI DELL'IPERFORINA, LORO USO E
FORMULAZIONI CHE LI CONTENGONO"**

MI 2002A 000871

a nome : **INDENA S.p.A.**

con sede in : **Milano**

* * *



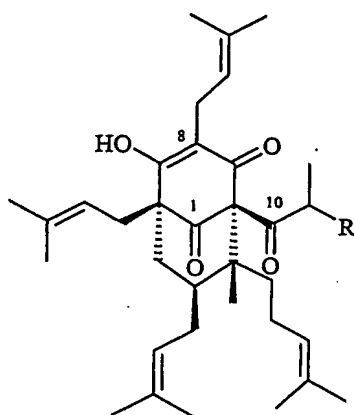
CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda derivati alogenati dell'iperforina e dell'adiperforina, il loro metodo di preparazione e il loro uso in campo farmaceutico e/o nutrizionale nel trattamento degli stati di depressione e di ansia e nella prevenzione o trattamento del morbo di Alzheimer.

STATO DELLA TECNICA

Le sommità fiorite di *Hypericum perforatum* contengono numerose classi di sostanze strutturalmente diverse, tutte dotate direttamente o indirettamente di attività a livello del sistema nervoso centrale. I meccanismi d'azione di questi composti sono differenti e comprendono un'azione anti-MAO (Suzuki O. et al. *Planta Med.*, 272-4, 1984), un'azione sul rilascio e sul re-uptake della serotonina (Muller W.E. et al. *Pharmacopsychiatry*, 30, 102-107, 1997) ed un'attività benzodiazepino-simile (Coot J.M. *Pharmacopsychiatry* 30, 108-112, 1997).

L'iperforina, un derivato della floroglucina, è uno dei maggiori costituenti della frazione lipofila delle sommità fiorite di *Hypericum perforatum*; tale frazione, anche se in concentrazione minore, contiene anche adiperforina, omologo superiore dell'iperforina (Erdelmeier C.A.J., *Pharmacopsychiatry*, 31, 2-6, 1998).



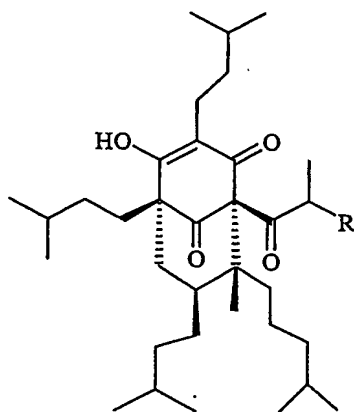
iperforina: R = CH₃
adiperforina: R = CH₂CH₃

L'iperforina è stata recentemente oggetto di numerosi studi attraverso i quali è stato possibile stabilire il suo importante ruolo antidepressivo (Pharmacopsychiatry, 31 Suppl.1,1-60,1998). È inoltre noto inoltre che gli estratti di *Hypericum perforatum* possono essere utilizzati per la profilassi ed il trattamento di malattie neurodegenerative, fra le quali il morbo di Alzheimer (WO/9940905, WO0057707). In particolare, sono stati descritti a questo scopo (WO9941220) sali dell'iperforina e dell'adiperforina con cationi inorganici o con sali d'ammonio.

E' noto dalla letteratura che l'iperforina, in condizioni normali di estrazione e conservazione, è poco stabile; secondo WO 97/13489 il contenuto di iperforina in un estratto idroalcolico di iperico si riduce drasticamente già dopo poche settimane. Sempre secondo WO 97/13489, per ottenere estratti stabili di iperforina, occorre la presenza di antiossidanti in tutte le fasi di lavorazione (estrazione, purificazione e conservazione). Se ne deduce quindi che l'alto grado di instabilità dell'iperforina la rende poco maneggevole per la preparazione di composizioni farmaceutiche. Per ovviare a tale inconveniente, recentemente sono stati preparati composti più stabili dell'iperforina, tra cui i

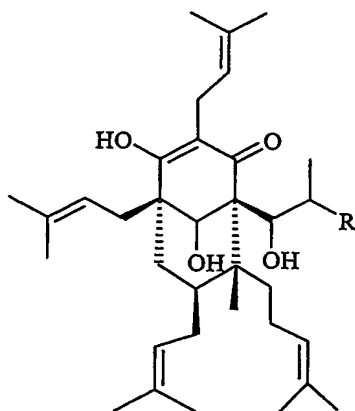
sopracitati sali descritti in WO 99/41220 e derivati funzionalizzati sull'ossidrilile (WO 99/64388).

È noto inoltre (Bystrov et al., Bioorg. Khim, 1978) che iperforina ed adiperforina possono essere trasformate nei corrispondenti ottaidroderivati (IIa e IIb) per riduzione delle catene isopreniche laterali



(IIa: R = CH₃
IIb: R = CH₂CH₃)

o nei corrispondenti tetraidroderivati (IIc e IIId) per riduzione a idrossile dei gruppi chetonici in posizione 1 e 10.



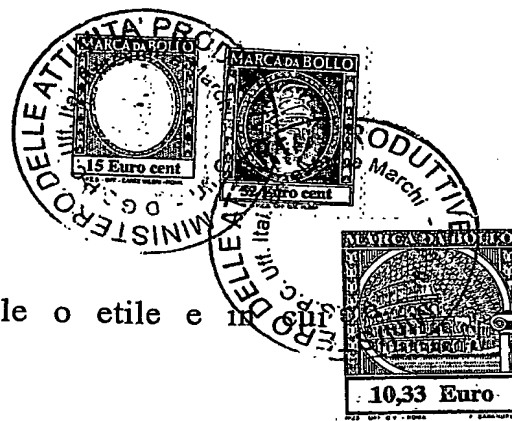
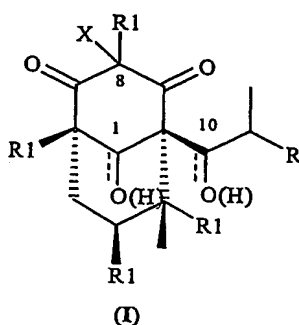
(IIc: R = CH₃
IIId: R = CH₂CH₃)

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che composti che si ottengono per introduzione di un alogeno in posizione 8 dell'iperforina, dell'adiperforina o di loro prodotti di

riduzione sono dotati di elevata stabilità e di attività antidepressiva, ansiolitica ed anti-neurodegenerativa sorprendentemente superiore a quella dell'iperforina e dell'adiperforina.

La presente invenzione riguarda in particolare composti di formula (I)



in cui X è un atomo di alogeno, R è metile o etile e in alternativa,

- R1 è 3-metil-2-buten-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi osso;
- R1 è 3-metil-but-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi osso;
- R1 è 3-metil-2-buten-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi;
- R1 è 3-metil-but-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi

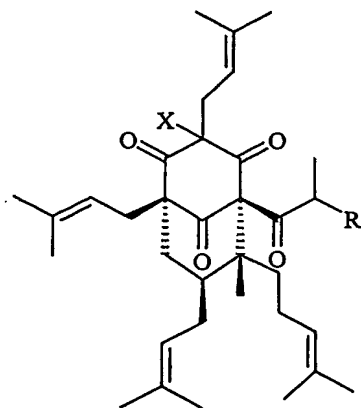
loro sali o esteri farmaceuticamente accettabili.

Con il termine alogeno si intende un alogeno scelto fra fluoro, cloro, bromo e iodio, più preferibilmente cloro e bromo, ancor più preferibilmente cloro.

Inoltre, ai fini della presente descrizione, il prefisso "ottaidro" indica i derivati dell'iperforina o dell'adiperforina in cui R1 è 3-metil-but-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi osso; il prefisso "tetraidro" indica i

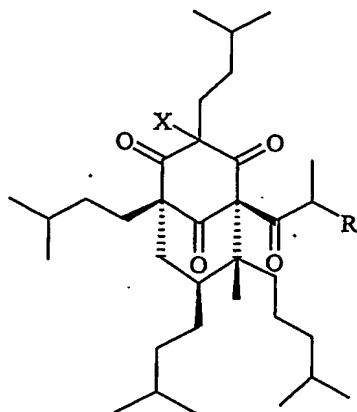
derivati dell'iperforina o dell'adiperforina in cui R1 è 3-metil-2-buten-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi; il prefisso "dodecaidro" indica i derivati dell'iperforina o dell'adiperforina in cui R1 è 3-metil-but-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi.

Composti preferiti secondo l'invenzione sono i composti di formula (I) in cui: X è un atomo di cloro o bromo, R è metile o etile, R1 è 3-metil-2-buten-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi osso (d'ora in poi definiti: 8-cloroiperforina **Ia**, 8-cloroadiperforina **Ib**, 8-bromoiperforina **Ic**, 8-bromoadiperforina **Id**)



(Ia: X = Cl, R = CH₃
Ib: X = Cl, R = CH₂CH₃
Ic: X = Br, R = CH₃
Id: X = Br, R = CH₂CH₃)

Sono inoltre preferiti i composti di formula (I) in cui: X è un atomo di cloro o bromo, R è metile o etile, R1 è 3-metil-but-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti gruppi osso (d'ora in poi definiti: 8-cloroottaidroiperforina **Ie**, 8-cloroottaidroadiperforina **If**, 8-bromoottaidroiperforina **Ig**, 8-bromoottaidroadiperforina **Ih**)



(Ie: X = Cl, R = CH₃
If: X = Cl, R = CH₂CH₃
Ig: X = Br, R = CH₃
Ih: X = Br, R = CH₂CH₃)

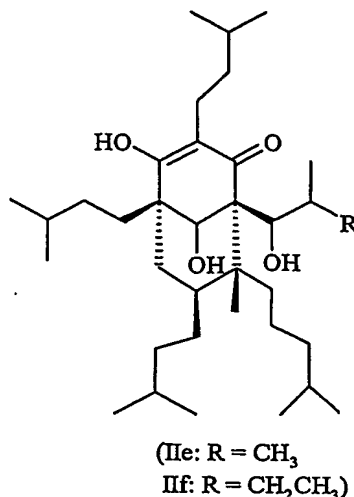
Più particolarmente preferiti sono 8-cloroiperforina (Ia) e 8-clorooctaidroiperforina (Ie).

I composti di formula (I) vengono preparati facendo reagire iperforina, adiperforina o un loro tetra-, otta-, dodecaidro derivato con un opportuno agente alogenante, preferibilmente con N-clorosuccinimide o N-bromosuccinimide.

I tetraidroderivati (IIa) e (IIb) come precedentemente indicati vengono ottenuti per riduzione dei gruppi chetonici con idruri, scelti ad esempio fra NaBH₄, Redal[®], Vitride[®], LiAlH₄.

Gli ottaidroderivati (IIc) e (IId) come precedentemente indicati vengono ottenuti per riduzione delle catene isopreniche laterali mediante idrogenazione catalitica, utilizzando ad esempio carbone palladiato o Nichel/Raney.

I dodecaidroderivati (dodecaidroiperforina IIe e dodecaidroadiperforina II_f)



vengono ottenuti dagli ottaidroderivati per trattamento con idruri come precedentemente indicato.

I dodecaidroderivati (IIe) e (II f) sono composti nuovi e sono anch'essi parte della presente invenzione.

Il procedimento per ottenere i composti dell'invenzione a partire dalle sommità fiorite di *Hypericum perforatum* può così essere riassunto:

Le sommità fiorite di *Hypericum perforatum* possono essere estratte con alcoli o chetoni alifatici puri o loro miscele con acqua o gas in condizioni supercritiche; l'estratto comunque ottenuto si ripartisce fra n-esano e miscele idroalcoliche con alcoli alifatici miscibili con acqua. Si controestrae la soluzione esanica con metanolo alcalino per estrarre iperforina ed adiperforina. Dopo acidificazione si tratta la soluzione metanolica con una resina a scambio ionico debolmente basica, che trattiene selettivamente iperforina ed adiperforina. La resina viene eluita con metanolo acido e l'eluato, dopo concentrazione a piccolo volume, viene diluito con acqua e controestratto con n-esano. Si concentra la soluzione esanica a piccolo volume ed il concentrato è pronto per la derivatizzazione. Si riprende questo residuo

in solventi clorurati e si addiziona del reattivo opportuno secondo le modalità riportate negli esempi.

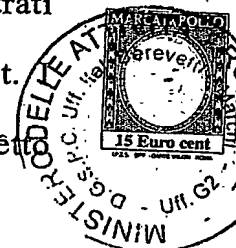
Oggetto della presente invenzione è inoltre l'uso dei derivati di formula (I) e dei loro sali o esteri farmaceuticamente accettabili per la preparazione di farmaci per la terapia della depressione, dell'ansia o per la terapia del morbo di Alzheimer.

I composti di formula (I), in particolare 8-cloro ed 8-bromo iperforina e 8-cloro ed 8-bromo adiperforina, hanno mostrato effetto antidepressivo.

L'effetto antidepressivo dei composti dell'invenzione è stato valutato nel ratto mediante il forced swimming test, valutando i parametri struggling, floating e swimming secondo quanto descritto da Cervo et al. in Neuropharmacology, 26, 14969-72, 1987. I prodotti sono stati somministrati in 3 dosi: 30 minuti dopo il pre-test, 5 ore e 30 minuti prima del test. I risultati riportati nella tabella sottostante dimostrano che i composti oggetto dell'invenzione risultano più attivi dell'iperforina da cui derivano.

Trattamento	mg/Kg	Struggling (sec.)	Floating (sec.)	Swimming (sec.)
Veicolo		7.0 ± 2.4	174.5 ± 15.9	118.5 ± 15.8
Cloroiperforina	3.125	46.9 ± 5.9	72.1 ± 6.7	181.0 ± 11.3
Cloroottaidroiperforina	6.25	57.3 ± 6.2	63.4 ± 9.2	165.6 ± 12.5
Iperforina	6.25	30.4 ± 4.6	60.4 ± 7.3	99.3 ± 10.6
Desimipramina	10	148.3 ± 12.6	53.0 ± 9.2	98.8 ± 7.9

I composti dell'invenzione si sono inoltre dimostrati particolarmente attivi contro il morbo di Alzheimer, grazie alla loro capacità di aumentare l'APPs, forma solubile e non dannosa dell'Alzheimer Precursor Protein (APP). E' noto infatti che la scissione proteolitica dell'Alzheimer Precursor



Protein (APP) è mediata sia dalla β - e γ -secretasi, dando luogo ad un'aumentata produzione di peptide amiloide A β 1-42 (che ha un ruolo centrale nel manifestarsi della malattia di Alzheimer), che dalla α -secretasi, dando luogo all'APPs solubile privo di attività patogena (Esler W.P., Wolfe M.S., Science, 293,1449-54, 2001).

L'effetto dei composti dell'invenzione sulla liberazione di APPs prodotto dalla α -secretasi è stato determinato nel mezzo di cultura di una linea cellulare di neuroblastoma (SH-SY5Y) secondo quanto riportato da Galbete J.L. et al. in Biochem J. 348,307-313,2000.

I risultati riportati nella seguente tabella indicano che i prodotti saggiati attivano il metabolismo dell'APP mediato dalla α -secretasi, inducendo un aumento di APPs secreto nel mezzo di cultura:

	APPs %
Controlli	100
Iperforina 10 μ M	296
Cloroiperforina 10 μ M	627
Cloroottaidroiperforina 10 μ M	855

I composti dell'invenzione possono essere formulati, secondo tecniche convenzionali, ad esempio secondo quanto descritto in Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII ed. Mack Pub., N.Y., U.S.A., in capsule di gelatina molle, capsule di gelatina dura, compresse, supposte; preferenzialmente l'estratto dell'invenzione viene formulato in capsule di gelatina molle o in formulazioni a rilascio controllato. Il dosaggio è compreso fra 10 e 100 mg pro dose nelle formulazioni normali e fino a 200 mg nelle formulazioni a rilascio controllato, essendo in questo caso la dose consigliata

di 200 mg pro dose/pro die. I prodotti possono essere inoltre somministrati per via transdermica a rilascio controllato applicando il formulato in zona prossimale alle derivazioni arteriose carotidee cerebrali. I dosaggi di composto in queste formulazioni vanno da 10 a 100 mg pro dose/pro die.

Gli esempi più sotto riportati illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

ESEMPI

Esempio 1 - Preparazione di cloroiperforina.

In un impianto di estrazione da 50 L vengono posti 10 kg di sommità fiorite di *Hypericum perforatum* unitamente a 30 L di metanolo ed il tutto viene lasciato a sé a temperatura ambiente per 3h; si ripete l'estrazione per altre tre volte, quindi si concentrano gli estratti riuniti sotto vuoto fino a 5 kg; si estrae il concentrato per tre volte con 5 L di n-esano per volta. La soluzione idrometanolica viene eliminata mentre quella esanica viene controestratta con metanolo alcalino per KOH fino all'esaurimento di iperforina e adipiperforina.

Questa soluzione viene neutralizzata e filtrata su una resina Amberlite basica debole, che trattiene in modo selettivo iperforina ed adipiperforina; il prodotto trattenuto viene rieluito con metanolo acido per acido fosforico; l'eluato metanolico viene concentrato sotto vuoto a 25°C e, dopo diluizione con acqua, controestratto con n-esano fino all'esaurimento di iperforina.

Si decolorano le fasi esaniche riunite con 0.3% di carbone e, dopo disidratazione su Na₂SO₄, si concentrano ad olio ad una temperatura non superiore a 40°C sotto vuoto. Si ottengono 0.52 Kg di un estratto di aspetto ceroso avente un contenuto in iperforina di circa il 90%.

Si riprende il residuo in 3 L di CH₂Cl₂ e si aggiungono, sotto energica

agitazione, 0.14 Kg di N-Clorosuccinimide. La soluzione è lasciata a sé per tre ore sotto agitazione a temperatura ambiente, controllando per TLC la scomparsa di iperforina utilizzando lastre di gel di silice ed una miscela di n-esano/acetato d'etile 9:1 come eluente. (Rf iperforina 0.20; cloroiperforina 0.80). Al termine della reazione si aggiungono 3 L di acqua; si elimina la fase acquosa mentre si lava quella organica con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ e poi si essicca su Na_2SO_4 . Dopo rimozione del solvente si cromatografa il residuo su gel di silice eluendo con una miscela n-esano/acetato d'etile 98:2. Si concentrano separatamente le frazioni contenenti il cloroderivato. Si ottengono 0.48 kg di prodotto che, dopo cristallizzazione da etere di petrolio, ha le seguenti caratteristiche chimico-fisiche e spettroscopiche: $[\alpha]_D + 16$ ($c = 0.5 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$);

IR ν^{max} (KBr) 1722, 1713, 1446, 1377, 1230, 1064, 831 cm^{-1} ;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): 1.41 (m, H-4), 2.16 (m, H-5), 1.70 (m, H-5'), 2.80 (m, H-11), 1.18 (d, $J = 7\text{Hz}$, H-12), 1.02 (d, $J = 7\text{Hz}$, H-13), 1.06 (s, H-14), 2.01 (m, H-15), 1.06 (m, H-15'), 5.03 (m, H-17), 1.66 (br s, H-19), 1.60 (br s, H-20), 2.05 (m, H-21), 1.65 (m, H-21'), 4.76 (m, H-22), 1.66 (s, H-24), 1.52 (s, H-25), 3.18 (s, H-26), 4.96 (m, H-27), 1.63 (br s, H-29), 1.69 (br s, H-30), 2.60 (m, H-31), 5.17 (dd, $J = 13.6$, H-32), 1.66 (s, H-35).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz CDCl_3): δ 207.6, 205.4, 198.7, 195.9, 139.2, 135.0, 134.1, 131.8, 124.5, 121.8, 118.9, 116.8, 85.1, 67.2, 65.1, 56.2, 45.7, 40.1, 38.5, 37.5, 31.6, 31.5, 28.2, 26.4, 26.1, 26.0, 25.9, 25.5, 22.2, 20.6, 18.6, 18.2, 18.1, 17.9, 13.9.

ESIMS m/z 593, 595 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (100, 38), 1163, 1165 [$2\text{M}+\text{Na}^+$] (32, 28).

Unitamente al composto precedente nella stessa separazione

cromatografica si ottengono anche 0.049 kg di cloroadiperforina aventi le seguenti caratteristiche chimico fisiche e spettroscopiche:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): δ 5.27-4.75 (4H, m, H-18, H-23, H-28, H-33), 2.23, 3.09 (2-H, dd, $J = 13.4, 8.4$ Hz, CH_2 -32), 2.63 (2H, m, CH_2 -27), 2.80-1.42 (10H, m, H-4, H-11, CH_2 -5, CH_2 -16, CH_2 -17, CH_2 -22), 1.82-1.55 (27H, s, CH_3 -20, CH_3 -21, CH_3 -25, CH_3 -26, CH_3 -29, CH_3 -30, CH_3 -31, CH_3 -35, CH_3 -36), 1.21 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -14), 0.87 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -13), 1.07 (3H, s, CH_3 -15).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz CDCl_3): δ 206.9, 205.4, 198.7, 196.7, 139.2, 135.0, 134.1, 131.9, 124.5, 121.8, 118.9, 116.8, 85.1, 67.2, 65.1, 56.2, 46.7, 45.7, 45.2, 37.5, 31.6, 31.5, 28.5, 28.2, 26.4, 26.1, 26.0, 25.9, 25.5, 18.6, 18.2, 18.1, 18.0, 16.8, 13.9, 11.6.

ESIMS m/z 607, 609 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (100, 34), 1191, 1193 [$2\text{M}+\text{Na}^+$] (21, 20).

Esempio 2 - Preparazione di ottaidroiperforina sale di dicicloesilammonio

50 g di iperforina ottenuta secondo quanto riportato nell'esempio vengono sciolti in 500 ml di acetato d'etile in presenza di 2 g di carbone palladiato al 5% e idrogenati fino a completo assorbimento di idrogeno. Dopo filtrazione del catalizzatore la soluzione etero-acetica viene concentrata secco nel vuoto ed il residuo viene sciolto in n-esano. Alla soluzione viene aggiunta una quantità stechiometrica di dicicloesilammina, che permette una cristallizzazione sufficientemente selettiva del sale corrispondente.

Si ottengono 62 g del sale di dicicloesilammonio di ottaidroiperforina avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): δ 3.03 (2H, m, CH-DCHA), 2.55-2.30, 2.10-1.76 (20H, m, CH_2 -DCHA), 1.70-1.10 (22H, m, H-4, H-11, CH_2 -5, CH_2 -



15, CH₂-16, CH₂-17, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-26, CH₂-27, CH₂-31, CH₂-32), 0.97-0.83 (24H, d, CH₃-19, CH₃-20, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-29, CH₃-30, CH₃-34, CH₃-35), 1.19, 1.12 (6H, d, J = 6.5 Hz, CH₃-12, CH₃-13), 0.91 (3H, s, CH₃-14).

¹³C-NMR (75 MHz CDCl₃): δ 213.1, 211.1, 186.3, 183.6 119.0, 82.5, 60.8, 53.5, 47.5, 44.2, 41.3, 41.0, 40.9, 38.2, 38.1, 37.8, 33.8, 31.0, 30.7, 30.0, 29.4, 28.8, 28.3, 27.9, 27.1, 25.4, 25.1, 24.9, 23.5, 23.2, 23.1, 22.9, 22.8, 22.7, 22.5, 13.7. ESIMS *m/z* 567 [M+Na⁺] (100), 1111 [2M+Na⁺] (91).

Esempio 3 - Preparazione di cloroottaidroiperforina

Ad una soluzione di 10 g di ottaidroiperforinato di dicicloesilammonio in 60 ml di cloruro di metilene si aggiungono 1.89 g di N-clorosuccinimide e la miscela viene lasciata sotto agitazione per 30 min. Alla fase organica si aggiungono 60 ml di acqua. Si lava la fase organica con una soluzione satura di Na₂S₂O₃ e quindi si essicca su Na₂SO₄; dopo concentrazione a secco del solvente si purifica il residuo su una colonna di gel di silice, eluendo il composto desiderato con una miscela di acetato d'etile/esano 95:5. Dopo concentrazione a secco delle frazioni si ottiene il composto desiderato come polvere bianca che, dopo ricristallizzazione da metanolo, fornisce 6.27 g di cloroderivato avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

¹H-NMR (300 MHz CDCl₃): δ 3.04-1.04 (22H, m, H-4, H-11, CH₂-5, CH₂-15, CH₂-16, CH₂-17, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-26, CH₂-27, CH₂-31, CH₂-32), 1.05-0.83 (24H, d, CH₃-19, CH₃-20, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-29, CH₃-30, CH₃-34, CH₃-35), 1.19, 1.03 (6H, d, J = 6.6 Hz, CH₃-12, CH₃-13), 1.03 (3H, s, CH₃-14).

¹³C-NMR (75 MHz CDCl₃): δ 207.6, 205.1, 199.3, 195.8, 84.9, 68.7,

64.5, 56.8, 46.1, 43.3, 40.2, 39.9, 38.1, 37.8, 34.8, 33.5, 31.3, 30.7, 29.0, 28.8, 28.2, 27.0, 24.8, 23.0, 22.9, 22.8, 22.7, 22.5, 22.4, 22.1, 20.6, 14.2.

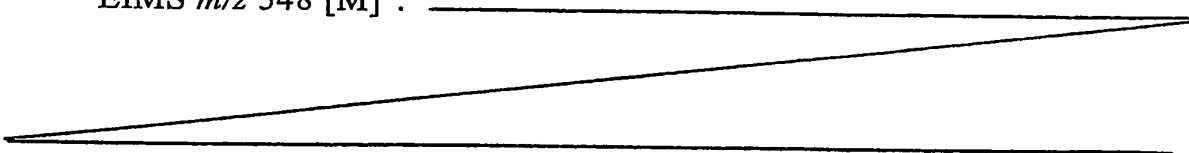
ESIMS m/z 601, 603 $[M+Na^+]$ (100, 38), 1179, 1181 $[2M+Na^+]$ (62, 48).

Esempio 4 - Preparazione di dodecaidroiperforina.

1,72 g di dicioesilammonio ottaidroiperforinato (P.M. = 716; 2,41 mmol) vengono sciolti, sotto agitazione magnetica, in 20 ml di THF; alla soluzione si aggiunge un forte eccesso (3.5 g) di $LiAlH_4$ (P.M.= 38; 0,092 mol). Il decorso della reazione viene seguito in TLC (eluente etere di petrolio/EtOAc 9:1 $R_{fp}=0,6$; $R_{fa}=0,6$; $R_{fc}=0,52$; $R_{fd}=0,18$). Dopo dieci minuti la reazione è ultimata.

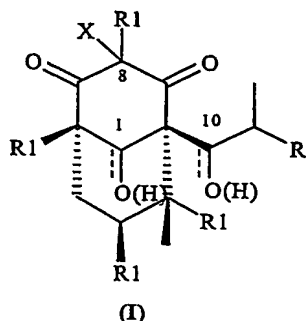
Si distrugge l'eccesso di reattivo secondo quanto descritto nell'esempio 4. Si filtra la miscela di reazione semisolido lavando accuratamente il residuo con acetato d'etile. La soluzione viene evaporata a secco, il grezzo di reazione viene sciolto in 15 ml di etere di petrolio/etere etilico 3:1 e la soluzione viene trasferita in imbuto separatore da 150 ml. La fase organica viene lavata tre volte con acido solforico 2N e successivamente con acqua salata. La fase acquosa viene eliminata, mentre quella organica, dopo disidratazione su Na_2SO_4 , viene concentrata a secco. Il prodotto ottenuto viene purificato per cromatografia su colonna su 75 g di gel di silice, eluendo il composto desiderato con etere di petrolio/acetato d'etile 99:1. Si ottengono 0.9 g di dodecaidroiperforina avente le seguenti caratteristiche chimico fisiche e spettroscopiche:

EIMS m/z 548 $[M]^+$.



RIVENDICAZIONI

1. Composti di formula (I)



in cui X è un atomo di alogeno, R è metile o etile e in cui
alternativamente,

a) R1 è 3-metil-2-buten-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti
gruppi osso;

b) R1 è 3-metil-but-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti
gruppi osso;

c) R1 è 3-metil-2-buten-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti
gruppi idrossi;

d) R1 è 3-metil-but-1-il e nelle posizioni 1 e 10 sono presenti
gruppi idrossi

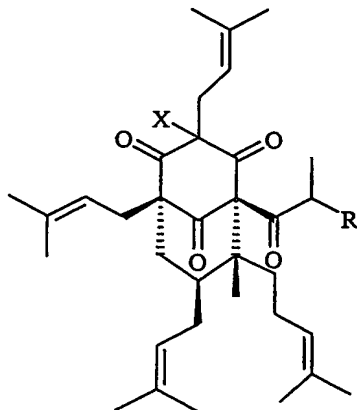
loro sali o esteri farmaceuticamente accettabili.

2. Composti secondo la rivendicazione 1 in cui X è cloro o bromo.

3. Composti secondo la rivendicazione 1 in cui X è cloro.

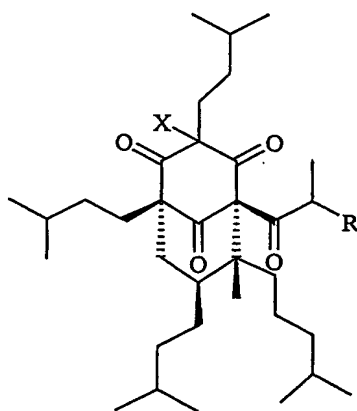
4. Un composto scelto fra:

8-cloroiperforina (Ia), 8-cloroadiperforina (Ib), 8-bromoiperforina (Ic),
8-bromoadiperforina (Id)



(Ia: X = Cl, R = CH₃
Ib: X = Cl, R = CH₂CH₃
Ic: X = Br, R = CH₃
Id: X = Br, R = CH₂CH₃)

8-clorooottaidroiperforina (Ie), 8-clorooottaidroadiperforina (If),
8-bromoottaidroiperforina (Ig), 8-bromoottaidroadiperforina (Ih)



(Ie: X = Cl, R = CH₃
If: X = Cl, R = CH₂CH₃
Ig: X = Br, R = CH₃
Ih: X = Br, R = CH₂CH₃)



5. Composti secondo una qualunque delle rivendicazioni 1-4 per uso come medicamento.
6. Uso dei composti di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 per la preparazione di farmaci per la terapia della depressione, dell'ansia e per la

terapia del morbo di Alzheimer.

7. Composizioni farmaceutiche contenenti un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 in miscela con opportuni eccipienti o veicoli.

Milano, 23 aprile 2002

Il Mandatario
(Bianchetti Giuseppe)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

G. Bianchetti

